

**Measurement of fluorescence cross-correlations for studying biological reactions comprises measuring correlation between fluorophore-labelled particles with different decay curves which are excited by identical spectral frequencies**

**Patent number:** DE19949658  
**Publication date:** 2001-05-10  
**Inventor:** LANGOWSKI JOERG (DE); WACHSMUTH MALTE (DE)  
**Applicant:** DEUTSCHES KREBSFORSCH (DE)  
**Classification:**  
- **international:** G01J3/457; G01N21/64  
- **european:** G01J3/457, G01N21/64F  
**Application number:** DE19991049658 19991014  
**Priority number(s):** DE19991049658 19991014

**Abstract of DE19949658**

Measurement of fluorescence cross-correlations comprises measuring the correlation between two or more types of fluorophore-labelled particles which have different decay curves and are excited by identical spectral frequencies. An Independent claim is included for a device for measurement of fluorescence cross-correlations comprising a system for exciting fluorophores in a sample (3) and a correlation detector (4, 5) equipped for time-resolved detection of fluorescence signals.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(12) **Offenlegungsschrift**  
(10) **DE 199 49 658 A 1**

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**G 01 J 3/457**  
G 01 N 21/64

(21) Aktenzeichen: 199 49 658.7  
(22) Anmeldetag: 14. 10. 1999  
(23) Offenlegungstag: 10. 5. 2001

(71) Anmelder:  
Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des  
öffentlichen Rechts, 69120 Heidelberg, DE

(74) Vertreter:  
Patentanwaltskanzlei Liermann - Castell, 52349  
Düren

(72) Erfinder:  
Langowski, Jörg, Prof.Dr., 69120 Heidelberg, DE;  
Wachsmuth, Malte, 69123 Heidelberg, DE

(56) Entgegenhaltungen:  
DE 197 57 740 C2  
DE 197 02 914 C2  
DE 197 35 119 A1  
DE 196 49 605 A1

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

(54) Verfahren und Vorrichtung zur Messung von Fluoreszenz-Kreuzkorrelationen  
(57) Bei der Messung von Fluoreszenz-Kreuzkorrelationen kann ein Kreuzkorrelationssignal gegenüber herkömmlichen Verfahren dadurch verbessert werden, daß Fluorophore mit unterschiedlicher Zerfallskurve, die jedoch bei identischer bzw. ähnlicher Frequenz angeregt werden können, zur Markierung der zur untersuchenden Teilchenspezies genutzt werden.

**DE 199 49 658 A 1**

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren sowie eine Vorrichtung zur Messung von Fluoreszenz-Kreuzkorrelationen.

Die Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie dient insbesondere der Untersuchung biologischer Reaktionen, wie der Proteinnimerisierung, der DNA-Hybridisierung oder der Protein-DNA-Bindung. Sie erlaubt die Bestimmung der hydrodynamischen Eigenschaften, Konzentrationen und Bindungskonstanten unter natürlichen Bedingungen, "in vitro" und in lebenden Zellen. Hierbei ist das Grundprinzip die Messung der Teilchenzahl einer fluoreszenzmarkierten Teilchenspezies und deren Fluktuationen in einem, vorzugsweise mikroskopischen, Volumen.

Dabei unterliegen die gemessenen Fluoreszenzsignale Fluktuationen. Eine Korrelation der gemessenen Signale ist dann ein Hinweis auf eine Komplexbildung der entsprechend markierten Teilchenspezies.

Neben Systemen mit einem Detektionskanal, die die Beobachtung einer möglichen Komplexbildung nur mit Hilfe der Veränderungen der Diffusionskonstanten erlauben, kann in bestehenden Systemen mit zwei Detektionskanälen, wie sie beispielsweise in der DE-A1-196 49 605 und in der DE-A1-197 35 119 beschrieben sind, die Bindung unterschiedlich markierter Teilchen mit Hilfe der Korrelationen der Fluoreszenzsignale in zwei spektral getrennten Kanälen untersucht werden. Diese Methode wird als Fluoreszenz-Kreuzkorrelationsspektroskopie bezeichnet.

Hierbei wird das Licht zweier Laserlinien in einem Mikroskop auf ein beugungsbegrenztes Fokusvolumen konzentriert und die erzeugte Fluoreszenz in zwei konfokal aufgebauten Detektoren nachgewiesen. Die Beugungsbegrenzung führt zu einer Skalierung der jeweiligen Fokusvolumina mit der Anregungs- bzw. Emissionswellenlänge, wobei chromatische Fehler zu einem Versatz führen. Daher ist die Überlappung der Foki nicht vollständig und keine maximale Korrelation der beiden untersuchten Kanäle möglich.

Es ist Aufgabe vorliegender Erfindung, ein Verfahren sowie eine Vorrichtung zur Messung von Fluoreszenz-Kreuzkorrelationen bereitzustellen, welche eine deutliche Verbesserung des meßbaren Kreuzkorrelationssignals ermöglichen.

Als Lösung schlägt die Erfindung einerseits ein Verfahren zur Messung von Fluoreszenz-Kreuzkorrelationen vor, bei welchen in einem spektralen Kanal die Korrelation mindestens zweier jeweils mit Fluorophoren markierter Teilchenspezies gemessen wird, wobei die Fluorophore unterschiedliche Zerfallskurven aufweisen und durch denselben spektralen Kanal angeregt werden können.

Insbesondere können für jede zu untersuchende Teilchenspezies unterschiedliche Fluorophore zur Anwendung kommen. Im allgemeinen zeichnen sich Fluorophore, die mit einem Anregelicht innerhalb eines spektralen Kanals angeregt werden können, durch erhebliche Unterschiede in ihren Zerfallskurven aus. Hierbei bezeichnet der Begriff "Zerfallskurve" das Abklingen des Fluoreszenzsignals, welches ein Fluorophor nach einer Anregung aussendet.

Ebenso können auch identische Fluorophore Anwendung finden, wenn diese aufgrund ihrer unterschiedlichen Bindungsarten an die zu untersuchenden Teilchenspezies unterschiedliche Quantenausbeuten bzw. unterschiedliche Lebensdauern aufweisen. Auch dieses bedingt unterschiedliche Zerfallskurven, die durch einen geeigneten Meßverlauf entsprechend separierbar sind.

Es versteht sich hierbei, daß die Anregung nicht zwingend durch elektromagnetische Wellen erfolgen muß, deren spektraler Bereich in dem landläufig mit Licht bezeichneten Bereich liegt. Vielmehr ist im vorliegenden Zusammenhang der Begriff "Anregelicht" auf jegliche elektromagnetische Welle, die der Anregung entsprechender Fluorophore dienen kann, zu lesen.

Es versteht sich darüber hinaus, daß bei der Anregung sowie bei den ausgesendeten Fluoreszenzsignalen eine gewisse Bandbreite auftreten kann, innerhalb derer das Anregelicht liegen muß, um in erwünschter Weise die verwendeten Fluorophore anzuregen und die unterschiedlichen Zerfallskurven zu erhalten. Insofern wird im vorliegenden Zusammenhang unter dem Begriff eines "spektralen Kanals" diejenige Bandbreite an elektromagnetischen Wellen verstanden, innerhalb welcher diese Fluorophore angeregt werden und mit unterschiedlichen Zerfallskurven Fluoreszenzsignale aussenden können.

Das Verfahren gestaltet sich besonders einfach, wenn die Anregung der Fluorophore durch eine einzige Laserlinie erfolgt. Eine derartige Laserlinie unterliegt keinerlei chromatischen Abweichungen, die eine Fokussierung behindern.

Besonders vorteilhaft ist eine zeitabhängige Messung der Fluoreszenzsignale. Eine derartige Messung ist unabhängig von chromatischen Fehlern durchführbar und kann mit verhältnismäßig hoher Präzision durchgeführt werden. Insbesondere ist es möglich, eine derartige zeitabhängige Messung der Fluoreszenzsignale auch unabhängig von der Verwendung zweier in einem spektralen Kanal anregbarer Fluorophore zu verwenden und beispielsweise bei verschiedenfarbig anzuregenden Fluorophoren trotz allem deren unterschiedlichen Zerfallskurven für eine zeitaufgelöste Messung zu nutzen.

Zur Durchführung einer zeitabhängigen Messung kann beispielsweise das Fluoreszenzsignal im Anschluß an einen Anregeimpuls zunächst in einem ersten Meßkanal und nach einem wählbaren Zeitintervall in einem zweiten Meßkanal gemessen werden. Eine derartige Anordnung ist verhältnismäßig einfach und somit kostengünstig in ihrem Aufbau. Sie gewährleistet darüber hinaus eine hohe Zuverlässigkeit in der Messung, wobei auch sehr kurze Zeiten bzw. Zeitintervalle mit modernen Technologien ohne weiteren Aufwand realisiert werden können.

Dementsprechend schlägt die Erfindung eine Vorrichtung zur Messung von Fluoreszenz-Kreuzkorrelationen mit Mitteln zum Anregen von Fluorophoren in einem Probenvolumen und mit einem Korrelationsdetektor zur Detektion von Korrelationen der Fluoreszenzsignale der angeregten Fluorophore vor, welche sich dadurch kennzeichnet, daß der Korrelationsdetektor Mittel zur zeitaufgelösten Detektion der Fluoreszenzsignale umfaßt.

Eine derartige Anordnung unterscheidet sich signifikanter Weise von allen bekannten Vorrichtungen zur Messung von Fluoreszenz-Kreuzkorrelationen, welche lediglich eine chromatische Separation der Fluoreszenzsignale vorsehen.

Insbesondere können die Mittel zur zeitaufgelösten Detektion zwei Meßkanäle und einen zeitabhängigen Schalter umfassen, der nach einem wählbaren Zeitintervall von einem ersten der beiden Meßkanäle auf den zweiten der beiden Meßkanäle schaltet. Wie bereits vorstehend beschrieben, zeichnet sich eine derartige Anordnung durch ihre hohe Zuverlässigkeit und die genau Meßmöglichkeit aus.

Vorteilhafterweise ist der zeitabhängige Schalter mit einem Anregeimpuls der Anregemittel getriggert. Dieses kann beispielsweise dadurch erfolgen, daß der Schalter gleichzeitig mit der Ansteuerung des Anregemittels, wie beispielsweise

eines Lasers, auf den ersten Meßkanal geschaltet wird. Ebenso ist es möglich, daß die Anregemittel selbst ein Signal aussenden, welches zur Triggerung des Schalters genutzt wird.

In einer ersten Ausführungsform können die Mittel zur zeitaufgelösten Detektion zwei Fluoreszenzsignal-Detektoren umfassen, die jeweils mit einem der beiden Meßkanäle verbunden sind, wobei der zeitabhängige Schalter mit den beiden Fluoreszenzsignal-Detektoren derart gekoppelt ist, daß wahlweise ein erster der beiden Fluoreszenzsignal-Detektoren oder der zweite der beiden Fluoreszenzsignal-Detektoren aktiviert ist. Eine derartige Anordnung ist verhältnismäßig schnell in ihrer Funktionsweise, da ein Verarbeiten der gesammelten Daten auch noch erfolgen kann, wenn der jeweilige Detektor inaktiviert ist.

Vorteilhafterweise ist ein erster der beiden Fluoreszenzsignal-Detektoren über einen teildurchlässigen Spiegel in den Strahlengang zwischen dem zweiten der beiden Fluoreszenzsignal-Detektoren und dem Probenvolumen gekoppelt.

Andererseits kann die Meßvorrichtung auch einen Fluoreszenzsignal-Detektor aufweisen, der über den zeitabhängigen Schalter wahlweise mit einem ersten der beiden Meßkanäle oder dem zweiten der beiden Meßkanäle verbunden werden kann. Diese Ausführungsform ist kostengünstiger als die vorher beschriebene, da lediglich ein Detektor Verwendung findet.

Vorteilhafterweise wird das Anregelicht über einen dichroitischen Spiegel in den Strahlengang zwischen dem Fluoreszenzsignal-Detektor des Korrelationsdetektors und dem Probenvolumen gekoppelt. Hierdurch erfolgt ein nahezu verlustfreies Einkoppeln des Anregelichtes in den Strahlengang und somit auf das Probenvolumen einerseits. Andererseits können die nicht polarisierten Fluoreszenzsignale ohne weiteres den dichroitischen Spiegel passieren.

Vorzugsweise ist das wählbare Zeitintervall ein Vielfaches, vorzugsweise mehr als das 2,5-fache, der kürzeren Zerfallszeit der Fluorophore. Bei einer derartigen Anordnung ist gewährleistet, daß ausreichend Lichtquanten durch den ersten Meßkanal erfaßt werden können und auf diese Weise eine gute Selektivität der beiden Meßkanäle hinsichtlich der beiden Fluorophore mit ihren unterschiedlichen Zeitintervallen erfolgt.

Erfolgt die Anregung der Fluorophore gepulst, so kann ohne weiteres eine laufende Messung und somit auch eine Beobachtung der Korrelation erfolgen. Vorzugsweise erfolgt die Anregung durch einen gepulsten Laser.

Vorzugsweise ist die Pulsdauer der Anregepulse wesentlich kleiner als die Zerfallszeit der Fluorophore. Auf diese Weise kann gewährleistet werden, daß die Anregung ansich die Messung der Fluoreszenzsignale nicht bzw. nur unwesentlich beeinflußt.

Darüber hinaus ist es vorteilhaft, wenn die Pulsfolge wesentlich größer als die Zerfallszeit der Fluorophore ist. Auf diese Weise kann ohne zusätzliche Maßnahmen eine Trennung der beiden Meßkanäle erfolgen, so daß diese ausreichend zwischen den beiden Fluorophore unterscheiden können und ein Übersprechen in vertretbaren Grenzen gehalten werden kann.

Im vorliegenden Zusammenhang bedeutet der Begriff "wesentlich", daß der Unterschied ausreichend groß ist, daß ein hieraus resultierender Meßfehler das Ergebnis nur unwesentlich beeinflußt. Insbesondere können die diesbezüglichen Werte derart gewählt werden, daß der Fehler in jedem Falle geringer ist, als dieses bei herkömmlichen Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopieverfahren möglich ist.

Weitere Vorteile, Ziele und Eigenschaften vorliegender Erfindung werden in der Beschreibung anliegender Zeichnung erläutert, in welcher beispielhaft zwei Ausführungsformen vorliegender Erfindung dargestellt sind. In der Zeichnung zeigen:

**Fig. 1** eine erste erfundungsgemäße Vorrichtung zur Messung von Fluoreszenz-Kreuzkorrelationen in schematischer Darstellung,

**Fig. 2** einen Teil einer zweiten erfundungsgemäßen Vorrichtung zur Messung von Fluoreszenz-Kreuzkorrelationen in schematischer Darstellung,

**Fig. 3** zwei beispielhafte Zerfallskurven sowie deren Summe und

**Fig. 4** ein Übersprechen in Abhängigkeit der Zerfallszeiten bzw. der effektiven Ausbeuten.

Bei der in **Fig. 1** dargestellten Vorrichtung zur Messung von Fluoreszenz-Kreuzkorrelationen wird ein gepulster Laser 1 über eine Mikroskopoptik 2 in ein Probenvolumen 3 fokussiert. Die emitierte Fluoreszenz wird in konfokal aufgebauten Fluoreszenzsignal-Detektoren 4, 5 gemessen. Diese Fluoreszenzsignal-Detektoren 4, 5 sind über eine Triggerelektronik 6 gegated, welche ihrerseits mittels einer Diode 7 angeregt wird. Die Diode 7 kann mittels eines teildurchlässigen Spiegels 8 mit Laserlicht bestrahlt werden.

Erzeugt nunmehr der Laser 1 einen Laserpuls, so gibt die Diode 7 ein Signal an die Triggerelektronik 6, die als Schalter wirkend ihrerseits eine Messung in dem Fluoreszenzsignal-Detektor 4 startet. Nach einem wählbaren Zeitintervall wird durch diesen Schalter diese Messung beendet und die Messung in dem Fluoreszenzsignal-Detektor 5 gestartet. Diese wird bis zu dem nächsten Laserpuls aufrechterhalten.

Bei dieser Anordnung ist der Fluoreszenzsignal-Detektor 4 über einen teildurchlässigen Spiegel 15 in den Strahlengang zwischen dem Fluoreszenzsignal-Detektor 5 und dem Probenvolumen 3 gekoppelt.

Die Detektorsignale werden an eine entsprechende Eingangskarte 9 eines Datenverarbeitungsgerätes mit zwei Meßkanälen 10, 11 übergeben. In diesem wird dann eine hart- und/oder softwareseitige Korrelationsanalyse der Signale durchgeführt.

Bei der in **Fig. 2** dargestellten Ausführungsform findet lediglich ein Detektor 12 Anwendung, dessen Meßsignal je nach Schalterstellung eines Schalters 13 den Meßkanälen 10 und 11 zugeführt wird. Hierbei wird der Schalter 13 durch die Triggerelektronik 6 in entsprechender Weise angeregt.

Beide Ausführungsformen zeichnen sich dadurch aus, daß sie mit einer bestehenden Computeranordnung sowie mit vorhandenen Korrelatorkarten zur Anwendung kommen können. Gegenüber einer Mehrfarben-Fluoreszenz-Kreuzkorrelation, bei welcher jedem Kanal eine bestimmte Farbe zugeordnet ist, erfolgt bei vorliegender Erfindung die Zuordnung zu einem bestimmten Zeitintervall.

Das Einkoppeln des Laserlichts in den Strahlengang der Mikroskopoptik bzw. in den Strahlengang zwischen den Fluoreszenzsignal-Detektoren (4, 5 bzw. 12) und dem Probenvolumen erfolgt durch einen dichroitischen Spiegel (14).

Nach einem Laserpuls zeigt ein Fluorophor der Sorte  $i = 1, 2$  die Zerfallskurve  $f_i(t) = a_i e^{-t/\tau_i}$ , wie in **Fig. 3** dargestellt.

Hierbei ist die Quantenausbeute pro Laserpuls  $QE_i = \int_0^\infty dt a_i e^{-t/\tau_i}$ . Im Folgenden ist die Zahl der Fluorophore im Fokusvolumen mit  $N_i$  und die Wiederholrate der Laserpulse mit  $v$  bezeichnet, wobei  $i = 1$  die schnell und  $i = 2$  die langsam zerfallende Komponente darstellt. Somit ist  $\tau_1 < \tau_2$ . Die Eigenschaften des Lasers sind derart gewählt, daß  $\tau_i \ll 1/v$  und  $1/v$  viel kleiner als die typischen Aufenthaltsdauern der Moleküle im Fokusvolumen sind.

5 Wird mit  $t_i$  das wählbare Zeitintervall nach einem Laserpuls bezeichnet, bis zu welchem der erste Meßkanal S (schnell) und ab welchem der zweite Meßkanal L (langsam) gemessen wird, so ergeben sich folgende, zu messende Signale

$$\begin{aligned}
 10 \quad F_S(t_i) &= v \int_0^{t_i} dt (N_1 a_1 e^{-t/\tau_1} + N_2 a_2 e^{-t/\tau_2}) \\
 15 &= v N_1 Q E_1 (1 - e^{-t_i/\tau_1}) + v N_2 Q E_2 (1 - e^{-t_i/\tau_2}) \\
 20 \quad F_L(t_i) &= v \int_{t_i}^{\infty} dt (N_1 a_1 e^{-t/\tau_1} + N_2 a_2 e^{-t/\tau_2}) \\
 &= v N_1 Q E_1 e^{-t_i/\tau_1} + v N_2 Q E_2 e^{-t_i/\tau_2}
 \end{aligned}$$

25 Um ein Übersprechen der langsam zerfallenden Komponente in den ersten Kanal S zu eliminieren, wird  $t_i$  derart gewählt, daß in  $F_L$  der erste Term vernachlässigbar ist. Auf diese Weise läßt sich der langsam zerfallende Anteil auf das Intervall  $[0, t_i]$  extrapoliieren und von  $F_S$  abziehen. Zur Abschätzung kann  $Q$  als das gewünschte Verhältnis der Zahl der bis  $t_i$  emittierten zu der ab  $t_i$  emittierten Photonen dienen. Hieraus folgt dann  $t_i = \ln(Q + 1) \tau_i$

30 Die Näherung für  $F_L$  ist aufgrund der verschiedenen Lebensdauern bei Quantenausbeuten gleicher Größenordnung gültig und wird, multipliziert mit  $(e^{t_i/\tau_2} - 1)$  von  $F_S$  abgezogen, um das korrigierte, von der Teilchenzahl der langsam zerfallenden Komponente unabhängige Signal zu erhalten. Hieraus folgt dann:

$$\begin{aligned}
 35 \quad \hat{F}_S &= F_S - F_L e^{-t_i/\tau_1 - 1} \\
 40 &= v N_1 Q E_1 \left( 1 - \exp \left( -t_i \frac{\tau_2 - \tau_1}{\tau_2 \tau_1} \right) \right) \\
 \hat{F}_L &= F_L \\
 45 &= v N_1 Q E_1 e^{-t_i/\tau_1} + v N_2 Q E_2 e^{-t_i/\tau_2}
 \end{aligned}$$

Das verbleibende Übersprechen der schnellen Komponente in den ersten Kanal L wird bei geeigneter Wahl der Parameter  $QE_i$  und  $\tau_i$  sehr klein. Es läßt sich für zwei Teilchenspezies bei identischen Volumina abschätzen als

$$50 \quad \frac{G_s(0)}{G_0(0)} = \left( 1 + \frac{\eta_2}{\eta_1} \exp \left( t_i \frac{\tau_2 - \tau_1}{\tau_2 \tau_1} \right) \right)^{-1}$$

55 Fig. 4 zeigt, daß das Übersprechen über einen großen Parameterbereich deutlich unter 10% liegt. Bei der Wahl der Fluorophore sollten  $\eta_2 - \eta_1$  sowie  $\tau_2 - \tau_1$  möglichst groß sein, damit  $t_i$  so klein gewählt werden kann, daß der zweite Meßkanal L noch ein ausreichendes Signal zeigt.

Da bei herkömmlichen Zweifarben-Kreuzkorrelationsmessungen eine vollständige Überlappung der Fokusvolumina nicht erreicht werden kann – dieses sind typischerweise weniger als 50% – und die hier vorgeschlagene Methode identische Foki aufweist, kann mit dem hier vorgeschlagenen Verfahren ein viel höheres Kreuzkorrelationssignal erreicht werden.

60 Als Fluorophore können beispielsweise die folgenden Kombinationen gewählt werden:

Name	Ref	$\lambda_{ex}[\text{nm}]$	$\lambda_{em}[\text{nm}]$	QE	$\tau[\text{ns}]$	Übersprechen
Cy-2	[1]	489	506	$\geq 0,12$	$\leq 2$	0,04
FITC	[3, 4]	494	518	$\sim 0,92$	3,6/4,11	
Cy-3,5	[1]	581	596	$\geq 0,15$	$\leq 2$	0,04
Texas Red	[2, 4]	595	615	$\sim 0,9$	4,5	

Hierbei bezeichnet [1] die Produktinformationen der Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden, [2] die Veröffentlichung Brismar, H., O. Trepte und B. Ulfhake. J. Histochem. Cytochem., 43: 699-707, 1995, [3] die Veröffentlichung Draaijer, A., R. Sanders und H. C. Gerritsen. In: Handbook of biological confocal microscopy, 2. Aufl., 491 bis 505, 1995 und [4] die Produktinformationen der Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA.

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Messung von Fluoreszenz-Kreuzkorrelationen, dadurch gekennzeichnet, daß in einem spektralen Kanal die Korrelation mindestens zweier jeweils mit Fluorophoren markierter Teilchenspezies gemessen wird, wobei die Fluorophore unterschiedliche Zerfallskurven aufweisen und durch denselben spektralen Kanal angeregt werden können.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß für jede Teilchenspezies unterschiedliche Fluorophore oder identische Fluorophore, die auf Grund ihrer unterschiedlichen Bindungsarten an die zu untersuchende Teilchenspezies unterschiedliche Quantenausbeuten und/oder unterschiedliche Lebensdauern aufweisen, zur Anwendung kommen.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Anregung der Fluorophore durch eine einzige Laserlinie erfolgt.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, gekennzeichnet durch eine zeitabhängige Messung der Fluoreszenzsignale.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Fluoreszenzsignal im Anschluß an einen Anregungspuls zunächst in einem ersten Meßkanal (10) und nach einem wählbaren Zeitintervall in einem zweiten Meßkanal (11) gemessen wird.
6. Vorrichtung zur Messung von Fluoreszenz-Kreuzkorrelationen mit Mitteln zum Anregen von Fluorophoren in einem Probenvolumen (3) und mit einem Korrelationsdetektor zur Detektion von Korrelationen der Fluoreszenzsignale der angeregten Fluorophore, dadurch gekennzeichnet, daß der Korrelationsdetektor Mittel zur zeitaufgelösten Detektion der Fluoreszenzsignale umfaßt.
7. Vorrichtung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Mittel zur zeitaufgelösten Detektion zwei Meßkanäle (10, 11) und einen zeitabhängigen Schalter (6, 13) umfassen, der nach einem wählbaren Zeitintervall von einem ersten der beiden Meßkanäle (10) auf den zweiten der Meßkanäle (11) schaltet.
8. Vorrichtung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß der zeitabhängige Schalter (6, 13) mit einem Anregungspuls der Anregemittel getriggert ist.
9. Vorrichtung nach Anspruch 7 oder 8, gekennzeichnet durch zwei Fluoreszenzsignal-Detektoren (4, 5), die jeweils mit einem der beiden Meßkanäle (10, 11) verbunden sind, wobei der zeitabhängige Schalter (6) mit den beiden Fluoreszenzsignal-Detektoren (4, 5) derart gekoppelt ist, daß wahlweise ein erster der beiden Fluoreszenzsignal-Detektoren (4, 5) oder der zweite der beiden Fluoreszenzsignal-Detektoren (4, 5) aktiviert ist.
10. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß ein erster der beiden Fluoreszenzsignal-Detektoren (4, 5) über einen teildurchlässigen Spiegel (5) in den Strahlengang zwischen dem zweiten der beiden Fluoreszenzsignal-Detektoren (4, 5) und dem Probenvolumen (3) gekoppelt werden kann.
11. Vorrichtung nach Anspruch 7 oder 8, gekennzeichnet durch einen Fluoreszenzsignal-Detektor (12) der über den zeitabhängigen Schalter (6, 13) wahlweise mit einem ersten der beiden Meßkanäle (10, 11) oder dem zweiten der beiden Meßkanäle (10, 11) verbunden werden kann.
12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 6 bis 11, gekennzeichnet durch einen dichroitischen Spiegel (14), über welchen Anregelicht in den Strahlengang zwischen einem Fluoreszenzsignal-Detektor (4, 5, 12) des Korrelationsdetektors und dem Probenvolumen (3) gekoppelt werden kann.
13. Verfahren nach Anspruch 5 bzw. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß das wählbare Zeitintervall ein Vielfaches, vorzugsweise mehr als das 2,5-fache, der kürzeren Zerfallszeit der Fluorophore beträgt.
14. Verfahren bzw. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Anregung der Fluorophore gepulst erfolgt.
15. Verfahren bzw. Vorrichtung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Anregung durch einen gepulsten Laser erfolgt.
16. Verfahren bzw. Vorrichtung nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Pulsdauer wesentlich kleiner als die Zerfallszeit der Fluorophore ist.

# DE 199 49 658 A 1

17. Verfahren bzw. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Pulsfolge wesentlich größer als die Zerfallszeit der Fluorophore ist.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

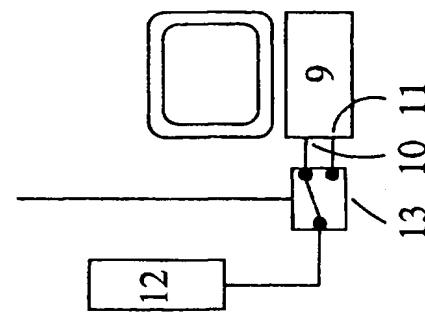


Fig. 2

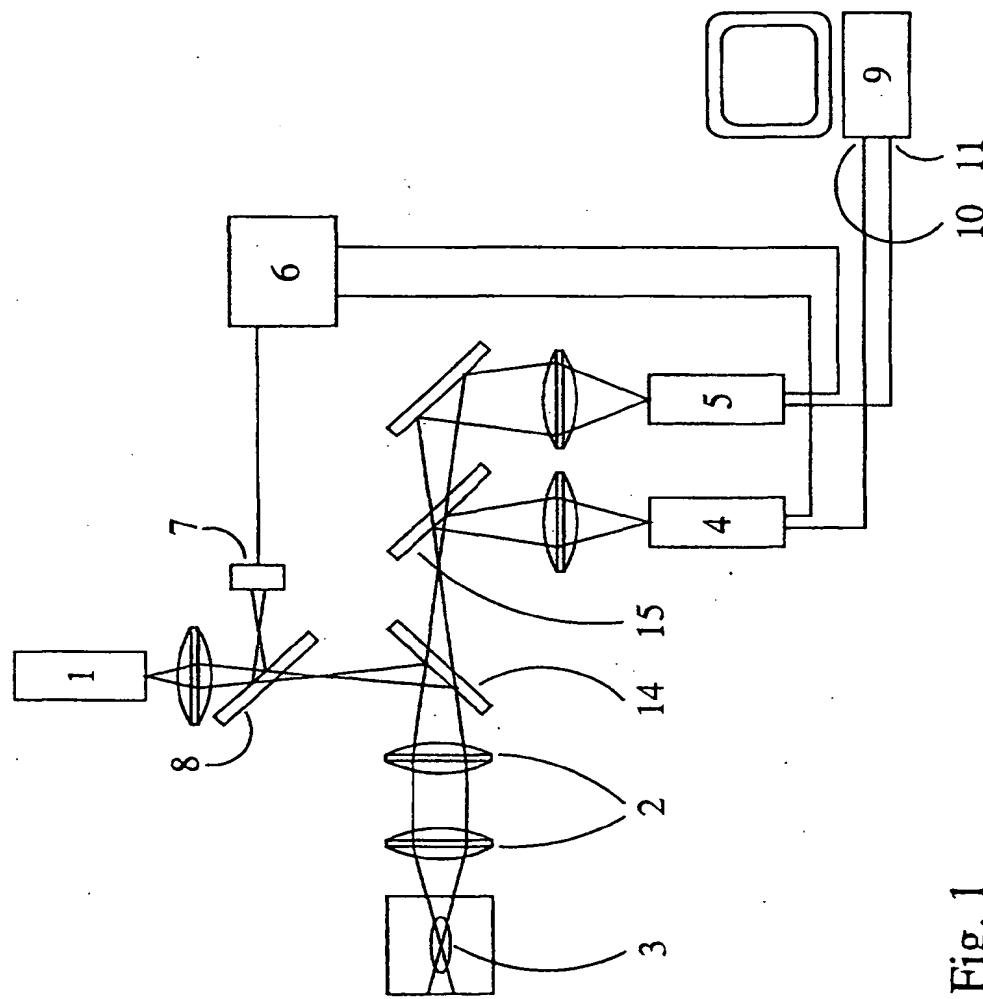


Fig. 1

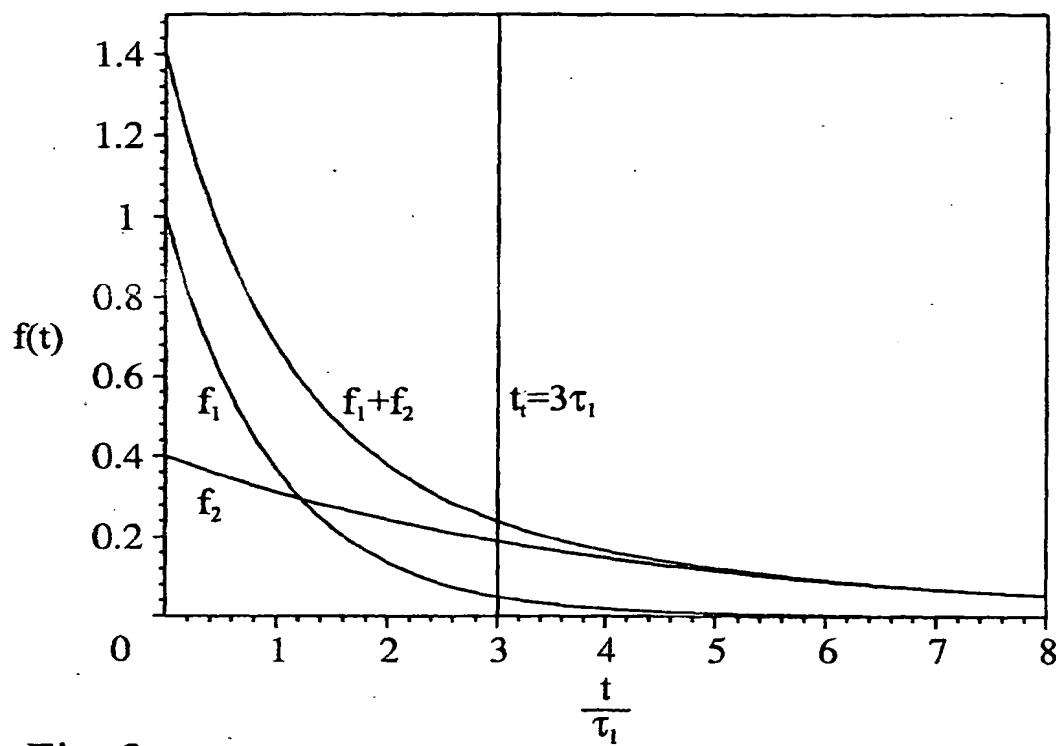


Fig. 3

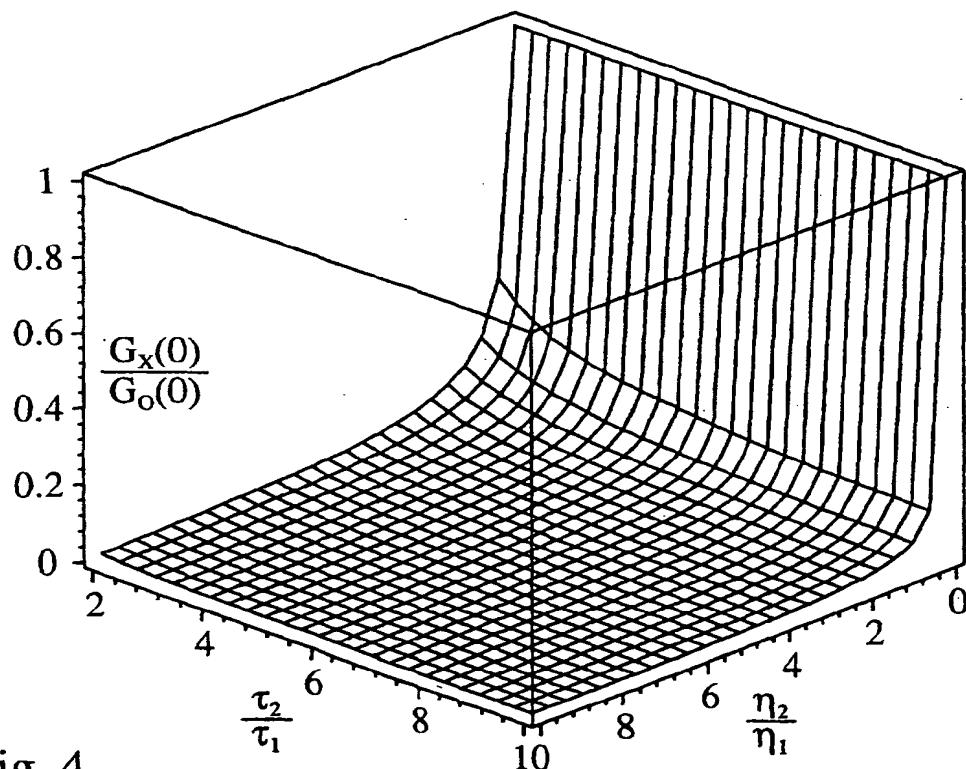


Fig. 4